



T/FR 00/00691

REC'D 15 MAY 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE** 09/936835

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **02 MAI 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÉGLE
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

This Page Blank (uspto)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

19 MARS 1999

99 03622 -

4

19 MARS 1999

1

**NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

CABINET GERMAIN & MAUREAU

BP 6153

69466 LYON CEDEX 06

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen



demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

MD/MK/B05B3355 04 72 69 84 30

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐

oui

☐

non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

BIO MERIEUX

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s)

Française

Adresse (s) complète (s)

Chemin de l'Orme

69280 MARCY L'ETOILE

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Mireille DIDIER
CPI 971202

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

M. DUEZ


DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MD/MK/B 05 B 3352 FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 03622	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CABINET GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06 FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PERRON	
Prénoms		Hervé	
Adresse	Rue	15 rue de Boyer	
	Code postal et ville	69005	LYON
Société d'appartenance (facultatif)		BIO MERIEUX	
Nom		LAFONT	
Prénoms		Monique	
Adresse	Rue	2 Hameau d'Alleray	
	Code postal et ville	75015	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		CNRS	
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 20 mars 2000 Mireille DIDIER CPI 971202			

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus lésionnel.

L'étiologie de la SEP est la source d'un débat d'actualité parce que la maladie pourrait avoir des causes multiples. Des arguments ont été avancés en faveur d'une hypothèse bactérienne, virale ou auto-immune.

Les rétrovirus sont des candidats potentiellement intéressants pour l'étude étiologique de la sclérose en plaques, par analogie avec une maladie ovine très proche de la SEP, induite chez le mouton par un rétrovirus exogène : le virus MAEDI-VISNA. L'infection expérimentale de moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la genèse de l'infection démyélinisante du mouton.

De nombreux travaux ont été réalisés pour étayer l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie et la découverte que HTLV-1, un oncovirus, est associé à une myélopathie chronique et progressive, la Paraparésie Spastique Tropicale (PST), a relancé l'intérêt pour les virus, sans qu'il ait pu être établi un lien de causalité entre virus et sclérose en plaques.

Récemment, les travaux de H. Perron et al. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561 ; " Current Concepts in Multiple Sclerosis " Wiethöler et al., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, 111-116 et the Lancet 1991 ; 337, 862-863) ont permis à partir d'une ponction lombaire de liquide céphalo-rachidien d'un patient SEP d'isoler une lignée non immortalisée de cellules non lymphoïdes et de mettre en évidence la présence d'un virus, présentant les caractéristiques d'un rétrovirus et montrant en particulier un pic correspondant à une activité transcriptase inverse, dans le surnageant de culture de cette lignée. Plus récemment encore, ces mêmes auteurs ont obtenu à partir de ce pic d'activité transcriptase inverse un ADN complémentaire qui correspondait au gène *pol* codant pour l'enzyme RT

(transcriptase inverse ou reverse transcriptase). Ce rétrovirus, appelé MSRV par les auteurs, a notamment été caractérisé au niveau génomique dans la demande de brevet PCT WO 99/02666. L'analyse phylogénique, par comparaison de la séquence de la région *pol* de MSRV avec d'autres
 5 séquences *pol* disponibles dans les bases de données a permis de montrer que MSRV est proche de la famille ERV-9 (endogenous retrovirus-9).

Par ailleurs, F. Beseme et al. dans la demande de brevet PCT WO 99/02696 ont criblé une banque d'ADNc à l'aide d'une sonde Ppol-
 10 MSRV et détecté des clones chevauchants qui leur ont permis de reconstruire un ARN génomique putatif de 7582 nucléotides. Cet ARN génomique présente une structure R-U5-*gag-pol-env*-U3-R caractéristique des rétrovirus et une interrogation de plusieurs bases de données a permis de montrer qu'il existe une quantité importante de séquences génomiques
 15 (ADN) apparentées dans le génome humain qui sont retrouvées sur plusieurs chromosomes. Les auteurs ont ainsi mis en évidence l'existence de structures partielles de type rétroviral dans le génome humain et envisagé leur rôle potentiel dans des maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques. Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes a été
 20 dénommée HERV-W, en raison de ses caractéristiques structurales. L'analyse phylogénique dans la région *pol* a montré que la famille HERV-W est liée aux familles ERV-9 et RTVL-H et appartient donc à la famille des rétrovirus endogènes de type I. Par ailleurs, l'analyse phylogénique de la trame de lecture ouverte de *env* montre qu'elle est plus proche des
 25 rétrovirus simiens de type D et des rétrovirus de la réticuloendothéliose aviaire que des rétrovirus mammifères de type C, suggérant une structure de génome chimérique C/D. Les analyses des arbres phylogéniques montrent que les familles ERV-9 et HERV-W dérivent de deux vagues d'insertion indépendantes.

30

Tous ces éléments plaident en faveur de l'implication d'éléments rétroviraux dans la sclérose en plaques.

Il semble, par ailleurs, maintenant probable que des
 35 manifestations auto-immunes peuvent être induites par l'expression de superantigènes (SAGs).

Les superantigènes sont des molécules susceptibles de se lier à des molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et à des séquences peptidiques caractéristiques de certaines familles de récepteurs des cellules T ($V\beta$). Ces superantigènes activent un grand nombre de clones T, indépendamment du peptide antigénique reconnu par leur TCR (récepteur des cellules T) en association avec le CMH de la cellule présentatrice d'antigènes. Les superantigènes sont des produits d'expression de micro-organismes, tels que bactéries et rétrovirus exogènes ou endogènes.

La Demanderesse a maintenant montré que l'expression d'un superantigène ou d'une protéine ayant certains effets de type superantigène est associée à un état pathologique, par exemple un état associé à la sclérose en plaques. L'activité superantigénique est induite directement ou indirectement par un agent effecteur, tel qu'une protéine ou un micro-organisme, en particulier un rétrovirus (MSRV-1). De plus, la Demanderesse a également mis en évidence une production stimulée de cytokines, telles que l'IL-6, dans des cellules mononuclées sanguines provenant de donneurs sains et mises en contact avec un extrait de surnageant de culture cellulaire SEP. Enfin, la Demanderesse a observé que les mêmes extraits provenant de patients SEP et/ou infectés par le rétrovirus MSRV-1 induisaient une mort par apoptose significativement élevée dans les mêmes cellules mononuclées sanguines. La Demanderesse a donc développé un procédé pour mettre en évidence les effets précités dans un échantillon biologique.

Les critères requis pour établir qu'une protéine ou qu'un micro-organisme est ou contient un superantigène ou une protéine ayant certains effets de type superantigène sont :

- (i) la capacité de la protéine ou du micro-organisme à induire l'expansion de certaines familles de lymphocytes porteuses au niveau de leur TCR d'une chaîne $V\beta$ particulière, et
- (ii) une activation des $V\beta$ indépendante de l'haplotype du CMH de classe II.

Il convient de noter que lorsque l'on parle d'activité superantigénique dans la présente invention, ceci signifie indifféremment l'expression d'un superantigène ou d'une protéine ayant certains effets de type superantigène (SAg-like).

5

L'invention concerne un procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, selon lequel on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 ou V β 17, préférentiellement V β 16.

10

Selon une variante avantageuse, on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et d'une co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, et préférentiellement des V β s 3 et 12.

15

En particulier, le procédé est appliqué à la détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique d'un patient atteint de sclérose en plaques.

Un procédé avantageux pour mettre en évidence l'activité superantigénique précitée comprend les étapes suivantes :

20

on prélève un surnageant de culture de cellules mononuclées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints de SEP,

on met en contact ledit surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononuclées sanguines provenant de donneurs sains, et

25

on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion.

Les cellules mononuclées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont notamment choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

30

L'invention a également pour objet, un procédé de détection d'un état pathologique, dans un échantillon biologique, selon lequel on met en évidence au moins l'un des paramètres suivants :

35

une activité superantigénique, telle que définie précédemment,
une stimulation de la production de cytokines, telles que l'IL-6,
une induction d'apoptose cellulaire.

De préférence, on détecte au moins deux des paramètres en association, en particulier on détecte une activité superantigénique et une induction d'apoptose ou une activité superantigénique et une stimulation de la production de cytokines.

5 De manière encore plus avantageuse, l'on détecte les trois paramètres en association.

L'état pathologique est en particulier associé à la sclérose en plaques.

10 L'activité superantigénique détectée selon le procédé de l'invention peut notamment être induite directement ou indirectement par un agent effecteur choisi parmi les protéines et microorganismes et par exemple les bactéries ou les rétrovirus tels que MSRV-1.

15 L'invention concerne aussi un procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique de patients atteints de sclérose en plaques, selon lequel on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7. A cette fin, on peut procéder comme suit :

20 on prélève un surnageant de culture de cellules mononuclées sanguines telles que les lymphocytes B et les monocytes, ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints de SEP,

25 on met en contact ledit surnageant de culture avec une série de cultures de cellules mononuclées sanguines provenant de donneurs sains, et

on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion.

Les expériences ont été réalisées à partir :

30 - de cellules mononuclées sanguines provenant de onze donneurs sains et purifiées sur un gradient de Ficoll. Le typage HLA DR de chaque donneur a été effectué au préalable.

35 - (i) d'un pool de surnageants de culture concentré par ultracentrifugation (100 000g x 2 heures) de lymphocytes B humains provenant de patients SEP (LBSEP) ou de témoins non-SEP (LBTE), et (ii) de surnageant de culture de cellules de plexus choroïdes humains provenant d'un patient SEP (GRE) et d'un témoin non-SEP (LES).

Un procédé tel que défini précédemment peut être utilisé pour le suivi thérapeutique de patients et/ou l'évaluation de l'efficacité de molécules à usage thérapeutique vis à vis des paramètres identifiés dans la présente description.

5

Exemple 1 : Préparation d'extraits de surnageants de culture de cellules provenant de patients atteints de SEP ou de témoins non SEP.

10 Les protocoles de culture des cellules de plexus choroïdes ont été décrits dans la demande de brevet PCT WO 93/20188.

1) Culture des cellules de plexus choroïdes.

15 Les cellules de plexus choroïdes sont obtenues à partir d'explants prélevés post-mortem et mis en culture, éventuellement après dissociation mécanique et/ou enzymatique des tissus prélevés. Les cellules qui prolifèrent dans la culture sont d'allure fibroblastique et correspondent à des cellules d'origine leptoméningées, parfois appelées "fibroblastes de plexus choroïdes". Elles peuvent être cultivées pendant un certain nombre
20 de passages et être congelées lors de passages intermédiaires et décongelées ultérieurement pour une nouvelle culture.

Les cellules LES (témoin non-SEP) et GRE (SEP) ont été décongelées puis remises en culture dans du milieu F-12 "complet" contenant :

25 pénicilline 200 U/ml
streptomycine 20 mg/l
L-glutamine 6 mM
pyruvate de sodium 1 %
acides aminés essentiels 1 %.

30 anticorps anti-IFN leucocytaire (anti-interféron alpha polyclonal commercialisé par Sigma) ajouté à 10 U/ml final.

Ce milieu est supplémenté de 30% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté à 56°C pendant 30 min La culture cellulaire se fait dans une étuve à 37°C humidifiée, en présence de 5% de CO₂. Le
35 changement du milieu s'effectue deux fois par semaine. Si les cellules adhérentes sont à confluence dans le fond du flacon, la culture est

dédoublée. Pour ce faire, le surnageant de culture (SC) est éliminé et remplacé par du milieu F12 complet-SVF 30% "frais". A l'aide d'un grattoir, ou d'un mélange trypsine-EDTA, les cellules sont décollées de la paroi du flacon. Puis, elles sont resuspendues soigneusement avant d'être
 5 partagées dans deux flacons de culture. On dit que la culture est dédoublée ou qu'elle a subi un passage.

Les SC sont recueillis et congelés à -80°C pour l'ultracentrifugation, après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 3000 tours/min pendant 30 min. Pour l'étude, un volume
 10 total de 400 ml environ a été décongelé, regroupé et homogénéisé avant ultracentrifugation, pour chaque culture (SEP/GRE et NON-SEP/LES).

2) Culture des lignées B lymphoblastoïdes.

- Obtention de lymphocytes B à partir du sang périphérique et
 15 établissement de lignées B lymphoblastoïdes immortalisées par l'EBV (Virus d'Epstein Barr).

Les lymphocytes humains sont isolés à partir de 50 ml de sang hépariné dilué au demi avec du RPMI 1640 par centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ils sont délicatement recueillis de l'anneau ainsi que des
 20 éventuels agrégats cellulaires pouvant flotter juste au dessous de l'anneau. Les cellules sont alors lavées deux fois dans du milieu RPMI 1640. Après ces lavages, les cellules sont resuspendues à la concentration de 2×10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 contenant :

25 pénicilline 200 U/ml
 streptomycine 20 mg/l
 L-glutamine 6 mM
 pyruvate de sodium 1 %
 acides aminés essentiels 1 %.
 anticorps anti-IFN leucocytaire (anti-interféron alpha
 30 polyclonal-Sigma) ajouté à 10 U/ml final.

Ce milieu est supplémenté de 20% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté à 56°C pendant 30 min.

Les flacons de culture sont incubés dans des étuves à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 après avoir ajouté
 35 au milieu de culture, 1 ml de surnageant filtré de culture productive EBV B95-8 (soit 10^5 particules virales EBV pour 4 à 5×10^6 lymphocytes totaux)

en présence de 200 μ l d'une solution de CSA-Sandoz (2 μ g de CSA pour 4 à 5×10^6 lymphocytes totaux) et ceci, jusqu'au premier changement de milieu de culture. Le changement du milieu de culture s'effectue deux fois par semaine. Les flacons sont entretenus pendant trois mois, au delà
5 desquels, si aucune prolifération lymphocytaire n'a débuté, le flacon est jeté. Lorsque la prolifération cellulaire a commencé dans un flacon, les cellules sont conservées dans le même flacon jusqu'à ce qu'un nombre significatif de colonies prolifératives forment des amas. Le "dédoublément" de la culture (passage ou repiquage) s'effectue après dissociation
10 mécanique des amas par pipetage et refoulement vigoureux. Les cultures ainsi obtenues correspondent à des lignées de lymphocytes B (lignées Lymphoblastoïdes). Quatre lignées provenant de SEP certaines et deux lignées provenant de témoins non-SEP ont été obtenues dans ces conditions.

15 - Congélation des cellules.

Les cellules sont lavées dans du milieu RPMI-SVF 20%. Le culot repris dans du SVF (1 ml environ pour 8×10^6 cellules) est transféré dans un cryotube pour la congélation. 200 μ l d'une solution de SVF DMSO préparée à l'avance et conservée à -20°C sont ajoutés à la suspension
20 cellulaire (concentration finale de DMSO = 10%) qui est alors légèrement vortexée. Les cellules sont ainsi congelées à -80°C dans du coton cardé, puis stockées le lendemain dans l'azote.

- Décongélation et remise en culture des cellules congelées dans du DMSO.

25 Les cellules décongelées à température ambiante sont lavées deux fois dans 10 ml de milieu RPMI-SVF 20% avant la remise en culture.

Les quatre cultures SEP et les deux cultures témoins sont remises en culture en même temps, avec les mêmes réactifs et les mêmes lots de milieux, mais cultivées dans des laboratoires de culture séparés (P3
30 et P2 respectivement). Les cultures individuelles ont été menées en parallèle pendant environ un mois, afin de recueillir un volume, après pool des SC séparés de chaque patient SEP et de chaque témoin, d'environ 600-800 ml de chaque type (LBSEP et LBTE). Ce volume a été réuni par congélation systématique à -80°C des surnageants prélevés deux fois par
35 semaine après une pré-centrifugation à 1800 tours/min pendant 10 min. pour sédimenter et récupérer les cellules en suspension, suivie d'une

deuxième pré-centrifugation à 3000 tours/min pendant 30 min. pour éliminer les débris cellulaires.

Les surnageants SEP et non-SEP ont été décongelés et regroupés séparément et mélangés (SEP = pool LBSEP et témoin = pool LBTE) avant ultracentrifugation (pools de 650 ml). Les culots d'ultracentrifugation d'un même pool centrifugé après répartition dans des tubes séparés de 40 ml, ont aussi été regroupés et mélangés avant aliquotage et congélation de l'extrait à tester, afin d'obtenir un extrait homogène sur tous les aliquotes d'une même origine.

10

3) Détection des mycoplasmes pouvant contaminer la culture.

Un kit (Boehringer) basé sur la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a été utilisé pour la détection de mycoplasmes afin de garantir l'absence de contamination mycoplasémique dans les cultures.

15

4) Obtention d'un concentrat de surnageant de culture par ultracentrifugation sur coussin de glycérol.

Les surnageants décongelés et préalablement débarrassés des débris cellulaires sont transférés dans des tubes pour ultracentrifugation. Un coussin de glycérol (PBS - glycérol 30%) de quelques cm est alors déposé dans le fond du tube. Après deux heures d'ultracentrifugation à 100 000 x g (calculé au milieu du tube) à 4°C et décélération lente (30 min.), le surnageant est éliminé, le culot repris dans du tampon PBS avec 10% de glycérol, regroupé et homogénéisé avec les culots des autres tubes du même pool d'origine et le tout est aliquoté sous 100 µl. Un aliquot sert pour le dosage d'activité transcriptase inverse (RT) et les autres sont conservés à -80°C. Les aliquots nécessaires sont décongelés pour les tests sur cellules mononucléées sanguines.

25

Exemple 2 : Préparation de cellules mononucléées sanguines provenant de onze donneurs sains dont le typage HLA DR a été établi.

	Donneurs	Typage HLA DR
5	1-	DR2-DR4
	2-	DR1-DR1 → DR1
	3-	DR3-DR11 (5)
	4-	DR13-DR8
	5-	DR13(6)-DR14 → DR6
10	6-	DR2-DR2 → DR2
	7-	DR3-DR12(5)
	8-	DR3-DR7
	9-	DR3-DR13
	10-	DR4-DR5
15	11-	DR4-DR4 → DR4

Les cellules mononucléées sanguines de 100 ml de sang, provenant des onze donneurs précités, sont séparées des hématies sur gradient de Ficoll (15 ml de Ficoll/25 ml de sang) par centrifugation 15 min. à 800 g. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu RPMI 1640 et recentrifugées dans les mêmes conditions avant d'être aliquotées et congelées dans l'azote gazeux à la concentration finale de 2×10^7 cellules/ml dans une solution de 90% de sérum humain décomplémenté et 10% de DMSO

25

Exemple 3 : Mise en culture de cellules mononucléées sanguines de donneurs sains.

Après décongélation rapide, les lymphocytes de donneurs sains (5×10^6 cellules) sont mis en contact 30 min. à 37°C avec 100 μ l de surnageants de culture concentrés (i) de LBSEP ou de LBTE ou (ii) de GRE ou de LES.

Après mise en contact, les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture (RPMI supplémenté de 10% de sérum humain AB décomplémenté et de gentamycine) et distribuées dans des cupules de plaques de culture à 24 puits à raison de 2×10^6 cellules par ml. La

35

viabilité des cellules et leur immunocompétence ont été vérifiées en introduisant en contrôle une activation par un mitogène classique (PHA à $5 \mu\text{g} / 2 \times 10^6$ cellules).

5 **Exemple 4 : Analyse du répertoire $V\beta$ des lymphocytes CD3.**

10 L'analyse du répertoire des CD3 a été réalisée en utilisant un anticorps anti-CD3 couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine et 12 anticorps anti- $V\beta$ couplés à la biotine (Immunotech-Coulter-Beckman). Ces douze anticorps sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Ac anti- V β	Référence	Cible Sag	Commentaires
V β 2	IM 2081	TSST-1	10% de CD3 + PBL
V β 3	IM 2109	SEB	
V β 5-1	IM 2082		4-7% de CD3 + PBL
V β 7	IM 2288		1.5-2.4 % de CD3 + PBL Superantigène diabète IDDM (Conrad et al., J Immunol, 1997)
V β 8	IM 1191	SEE, N protéine rage	2.6-5.1% de CD3 + PBL Superantigène rage (Lafon et al., Nature 1992)
V β 12	IM 2019	SEB (12a)	1.1-1.9% de CD3 + PBL
V β 13-1	IM 2021	EBV	1.8-3.3% de CD3 + PBL Superantigène Epstein Barr (Sutkowski et al., J. Exp. Med. 1996)
V β 14	IM 2022		2.2-5.6% de CD3 + PBL
V β 16	IM 2023		1.1- 2 % de CD3 + PBL
V β 17	IM 1194	MAM, SEB	3.3-7% de CD3 + PBL
V β 21-3	IM 2025		2.2-3.6 % de CD3 + PBL
V β 22	IM 2026		2.4-5.1 % de CD3 + PBL

Après 24 heures de culture, le contenu des cupules a été cultivé respectivement en présence de LBSEP, LBTE et PHA, ou GRE, LES, et PHA est récolté. Le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C pour la détection ultérieure de cytokines. Les cellules sont lavées dans du tampon phosphate, réparties dans des microtubes et incubées avec un anticorps anti-CD3 marqué à l'isothiocyanate de fluoréscéine ($0,5\text{ }\mu\text{g}$ pour 5×10^5 cellules) et avec chaque anticorps anti-V β biotinylé ($1\text{ }\mu\text{g}$ d'anticorps pour 2×10^6 cellules), pendant 30 min à 4°C simultanément. Les cellules sont ensuite lavées dans du tampon phosphate et incubées 30 min à 4°C avec de la streptavidine couplée à la phycoérythrine ($1\text{ }\mu\text{l}$ dans $50\text{ }\mu\text{l}$ de suspension cellulaire). A l'issue de ce temps d'incubation, les cellules sont lavées et resuspendues dans $250\text{ }\mu\text{l}$ de Cell Fix (nom commercial) avant d'être analysées en cytofluorimétrie. L'immuno-fluorescence est mesurée à l'aide d'un cytofluorimètre FACSCALIBUR (nom commercial) équipé du logiciel CellQUEST II (nom commercial) (Becton-Dickinson).

Pour chaque culture et chaque anticorps, les pourcentages de cellules exprimant un V β particulier parmi les cellules CD3+ totales sont calculés. La taille des familles est comparée dans les cultures activées par LBSEP, LBTE, LES et GRE). Une augmentation de 31% d'une famille V β dans une culture LBSEP ou GRE par rapport aux témoins négatifs est considérée comme une augmentation significative.

Exemple 5 : Détection des cytokines produites.

Les cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- α et INF- γ) ont été mesurées à l'aide de kits ELISA d'immunocapture Optalia (nom commercial) de chez Pharmingen-Becton-Dickinson, sur plaques de titration de 96 puits selon les recommandations du fabricant. Une référence constituée d'une gamme de dilutions de cytokine recombinante de concentration connue (en pg/ml) est incluse sur chaque plaque d'essai. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde 405 nm pour la lecture du chromogène ABTS (Boehringer Mannheim). La recherche des cytokines est effectuée dans $50\text{ }\mu\text{l}$ de surnageants de culture 24 heures après la mise en contact pour 8 donneurs stimulés avec LBSEP ou LBTE et dans les surnageants de cultures 24 heures et 72

heures après la mise en contact pour 6 donneurs stimulés avec LES ou GRE.

Les résultats sont exprimés en pg/ml de surnageant, correspondant à la production de 2×10^6 cellules.

5

Exemple 6 : Estimation du pourcentage de cellules en apoptose.

Le pourcentage de lymphocytes entrés en apoptose a été mesuré dans les populations de PBL mises en culture pendant 24 heures avec LBSEP ou LBTE- pour 8 donneurs, d'une part, et dans les populations mises en culture avec LES et GRE pour 9 donneurs d'autre part.

L'apoptose a été estimée au cytofluorimètre en prenant en compte les caractéristiques de taille et de granulométrie existant entre les cellules vivantes et les cellules en apoptose, comme décrit pour les lymphocytes Jurkat (Thoulouze *et al* J. Virol.71, 7372-7380, 1997).

15

Exemple 7 : Détection d'antigènes viraux dans les cultures de lymphocytes.

Deux mélanges d'anticorps ont été utilisés pour détecter la présence d'antigènes viraux dans les lymphocytes humains cultivés en présence d'extraits de SC de plexus choroïdes LES et GRE sur lesquelles l'analyse de l'expansion des familles TCR (récepteur des cellules T) V β a été réalisée.

On a réalisé (i) un premier pool (pool 1) d'anticorps polyclonaux, obtenus chez le lapin avec 1 μ l de chacun des trois anticorps polyclonaux, et (ii) un deuxième pool (pool 2) d'anticorps monoclonaux obtenus après immunisation de souris avec 1 μ l de chacun des trois anticorps monoclonaux,. Ces anticorps polyclonaux et monoclonaux sont dirigés contre les protéines codées par les séquences *env*, *gag* et *pol* de MSRV-1 décrites dans les demandes de brevet WO-A-98/23755 et WO-A-99/02666.

Des lymphocytes humains provenant de donneurs sains (10^6 cellules par coloration) sont mis en contact 24 heures avec des surnageants ultracentrifugés de cellules de plexus choroïdes LES ou GRE. Les lymphocytes sont ensuite lavés dans du milieu RPMI. Le culot cellulaire

35

est repris dans 500 μ l de tampon de fixation (tampon phosphate 3% de paraformaldéhyde) et incubé pendant 20 min. à 4°C. Après deux lavages dans un tampon de perméabilisation (tampon phosphate contenant 1% de sérum de veau fœtal, 0,1% d'azide de sodium, 0,1% de saponine), les

5 cellules fixées sont incubées pendant 30 min. à 4°C avec 3 μ l de chacun des pools anti-MSRV-1, dans un volume final de 50 μ l de tampon de perméabilisation. Après un lavage dans du tampon de perméabilisation, les cellules incubées avec les anticorps anti-MSRV-1 du pool 1 sont incubées

10 30 min. à 4°C avec des anticorps biotinylés dirigés contre les immunoglobulines de lapin (Byosis, dilution 1/2000), lavées, puis incubées 30 min. à 4°C avec de la streptavidine couplée à de l'isothiocyanate de fluoréscéine (Strep-FITC 1/50°, Immunotech Coulter-Beckman). Les cellules incubées avec les anticorps anti-MSRV-1 du pool 2 sont incubées avec des

15 anticorps couplés à la biotine dirigés contre les anticorps de souris (Amersham, 1/500), puis, après lavage, avec de la Strep-FITC. Les cellules resuspendues dans 250 μ l de Cell-fix sont ensuite analysées par cytofluorimétrie.

Exemple 8 : Analyse des répertoires V β des lymphocytes CD3.

20

L'analyse des répertoires des huit donneurs est réalisée par double marquage sur des cellules mises en contact 24 heures, soit avec LBSEP, soit avec LBTE. Ces mêmes donneurs ont été testés en présence de LES et GRE.

25

Le pourcentage de cellules exprimant un V β particulier parmi les lymphocytes CD3 dans les cultures de lymphocytes stimulées par LBSEP est comparé à celui obtenu dans les cultures stimulées par LBTE. Les répertoires V β utilisés par deux donneurs (donneur 1 et donneur 5) en

30 réaction à LBSEP (histogrammes sombres) et à LBTE (histogrammes clairs) sont présentés sur les Figures 1 (donneur 1) et 2 (donneur 5). Pour le donneur 1, les pourcentages de V β utilisés pour répondre à LBSEP sont identiques à ceux utilisés pour répondre à LBTE, à l'exception de V β 7. En revanche, pour le donneur 5, le pourcentage de V β 3 et de V β 16 recrutés par LBSEP est différent de ceux recrutés par LBTE (respectivement 8.2 et

35 13.6 pour V β 3 et 2.1 et 4.2 pour V β 16).

Une augmentation de 31% d'une famille V β par rapport au pourcentage obtenu dans les cultures de lymphocytes LBTE est considérée comme la marque d'une expansion significative d'une famille de V β particulier par LBSEP.

5

L'analyse comparative utilisant ce critère est présentée dans le tableau 2 ci dessous.

10

Tableau 2

15

N°	HLA	V β 2	V β 3	V β 5	V β 2	V β 8	V β 12	V β 13	V β 14	V β 16	V β 17	V β 21	V β 22
1	DR 2/4												
4	DR 13/8												
5	DR 13/14												
7	DR 3/12												
8	DR 3/7												
9	DR 3/13												
10	DR 4/5												
11	DR 4/4												
	%age	12.5	37.5	0	13	13	37.5	0	12.6	75	12.5	0	12.5

20

Après un contact avec les LBSEP, on observe que :

25

75 % (6/8) des donneurs présentent une expansion de la famille V β 16,

37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille V β 12,

30

37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille V β 3, et

12,5 % (1/8) des donneurs présentent une expansion de l'une des familles V β 2, 7, 8, 14, 17 ou 22.

35

Les résultats obtenus avec les préparations LES et GRE peuvent être illustrés par l'analyse des répertoires obtenus avec les donneurs 10 et

11. GRE induit l'expansion de V β 16. Les expansions obtenues avec GRE sont du même ordre et de même nature que celles obtenues avec LBSEP. Par contre, les expansions obtenues avec LES sont significativement supérieures à celles obtenues avec LBTE.

5

L'expansion V β 16 n'est pas liée à la présence d'un DR particulier, puisqu'elle peut être obtenue aussi bien dans un environnement DR3 que DR4, DR5, DR8, DR13 ou DR14, c'est à dire avec 6 des 8 haplotypes exprimés par les 6 donneurs.

10

LBSEP n'induit généralement chez les donneurs que l'expansion d'une ou deux familles V β , sauf dans deux cas : un donneur présente à la fois une expansion des V β 3,12,14,16 et 22, un autre à la fois de V β 12 et V β 16. Les haplotypes de ces deux donneurs sont DR4/4 et DR4/5 respectivement.

15

Exemple 9 : Stimulation de la production de cytokines.

Les cultures de lymphocytes stimulés par LBSEP se distinguent par des productions significativement supérieures d'IL-6 et d'INF- γ comparées à celles stimulées par LBTE. Les titres de TNF- α sont très faibles en revanche et équivalents pour les deux types de cultures. Les résultats, exprimés en pg/ml de culture correspondant à 2×10^6 cellules. Ces résultats sont présentés dans le tableau 3.

25

Tableau 3

	LBSEP	LBTE
IL-6 (n = 6)	714	220
INF- γ (n = 3)	716	383
TNF- α (n = 6)	83	54

Exemple 10 : Apoptose.

Le pourcentage d'apoptose dans les cultures de lymphocytes stimulés avec LBSEP est significativement supérieur à celui obtenu dans les cultures de lymphocytes stimulés par LBTE. (moyenne du pourcentage d'apoptose de 38,35 pour LBSEP contre 28% pour LBTE).

Exemple 11 : Détection d'antigènes viraux dans les cultures de lymphocytes.

La présence d'antigènes rétroviraux spécifiques a été recherchée à l'aide des deux pools d'anticorps dirigés contre des protéines de MSRV-1. Les résultats d'immunofluorescence sur les cultures inoculées avec du SC ultracentrifugé de LES ou GRE, obtenus avec les deux pools (pool 2 = monoclonaux de souris, pool 1 = polyclonaux de lapin) sont présentés dans la table 4 pour les donneurs 10 et 11. Les chiffres représentent les pourcentages de cellules présentant des intensités de fluorescence comprises entre les canaux 100 et 1000.

Tableau 4

	Donneur 10		Donneur 11	
	LES	GRE	LES	GRE
Pool 1	0.6	22.6	0.4	4.76
Pool 2	7.11	30.77	0.12	4.69

Les résultats sont présentés comme des pourcentages de population exprimant une intensité de fluorescence comprise entre les canaux 100 et 1000.

L'expansion d'un nombre restreint de familles V β chez une majorité de donneurs en l'absence de restriction HLA indique que la réponse s'apparente à une réponse de type superantigène. La production de cytokines de type inflammatoire (IL-6, IFN- γ) conforte l'existence d'un environnement favorable au recrutement lymphocytaire.

L'absence d'activation de la sous population V β 13.1 et la similitude des résultats obtenus avec les extraits de cultures individuelles de plexus choroïdes (exempts d'EBV) excluent formellement l'éventuelle mesure d'un effet superantigénique dû au virus EBV. L'absence de
5 production de TNF- α est un argument en faveur de l'absence de contamination par des superantigènes bactériens ou du LPS.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une
5 expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 ou V β 17.

2. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes
10 porteurs d'un déterminant V β 16.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et d'une co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s
15 choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des V β s 3 et 12.

4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique provient d'un patient atteint
20 de sclérose en plaques.

5. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que :

25 on prélève un surnageant de culture de cellules mononuclées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints de SEP,

on met en contact ledit surnageant de culture avec une série de cultures de cellules mononuclées sanguines provenant de donneurs sains,
et

30 on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les cellules mononuclées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

7. Procédé de détection d'un état pathologique dans un échantillon biologique caractérisé en ce que l'on met en évidence au moins l'un des paramètres suivants :

- 5 une activité superantigénique, telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 5,
- une stimulation de la production de cytokines, telles que l'IL-6 et INF- γ
- une induction d'apoptose cellulaire.

10 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'on détecte au moins deux des paramètres en association.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'on détecte une activité superantigénique et une induction d'apoptose ou une
15 activité superantigénique et une stimulation de la production de cytokines.

10. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que l'on détecte les trois paramètres en association.

20 11. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'état pathologique est associé à la sclérose en plaques.

12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite directement ou
25 indirectement par un agent effecteur choisi parmi les protéines et microorganismes.

13. Procédé selon la 12, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi les bactéries et les rétrovirus.
30

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le rétrovirus est MSRV-1.

15. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique de patients atteints de sclérose en plaques,
35 caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que :
on prélève un surnageant de culture de cellules mononuclées
sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules
5 leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints de SEP,
on met en contact ledit surnageant de culture avec une série de
cultures de cellules mononuclées sanguines provenant de donneurs sains,
et
on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion.

10

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les
cellules mononuclées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont
choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

Une augmentation de 31% d'une famille V β par rapport au pourcentage obtenu dans les cultures de lymphocytes LBTE est considérée comme la marque d'une expansion significative d'une famille de V β particulier par LBSEP.

5

L'analyse comparative utilisant ce critère est présenté dans le tableau 2 ci dessous.

10

Tableau 2

N°	HLA	V β 2	V β 3	V β 5	V β 7	V β 8	V β 12	V β 13	V β 14	V β 16	V β 17	V β 21	V β 22
1	DR 2/4				X								
4	DR 13/8						X			X			
5	DR 13/14		X							X			
7	DR 3/12										X		
8	DR 3/7		X							X			
9	DR 3/13					X				X			
10	DR 4/5		X				X		X	X			X
11	DR 4/4	X					X			X			
	% age	12,5	37,5	0	13	13	37,5	0	12,6	75	12,5	0	12,5

Après un contact avec les LBSEP, on observe que :

15

75 % (6/8) des donneurs présentent une expansion de la famille V β 16,

37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille V β 12,

20 37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille V β 3, et

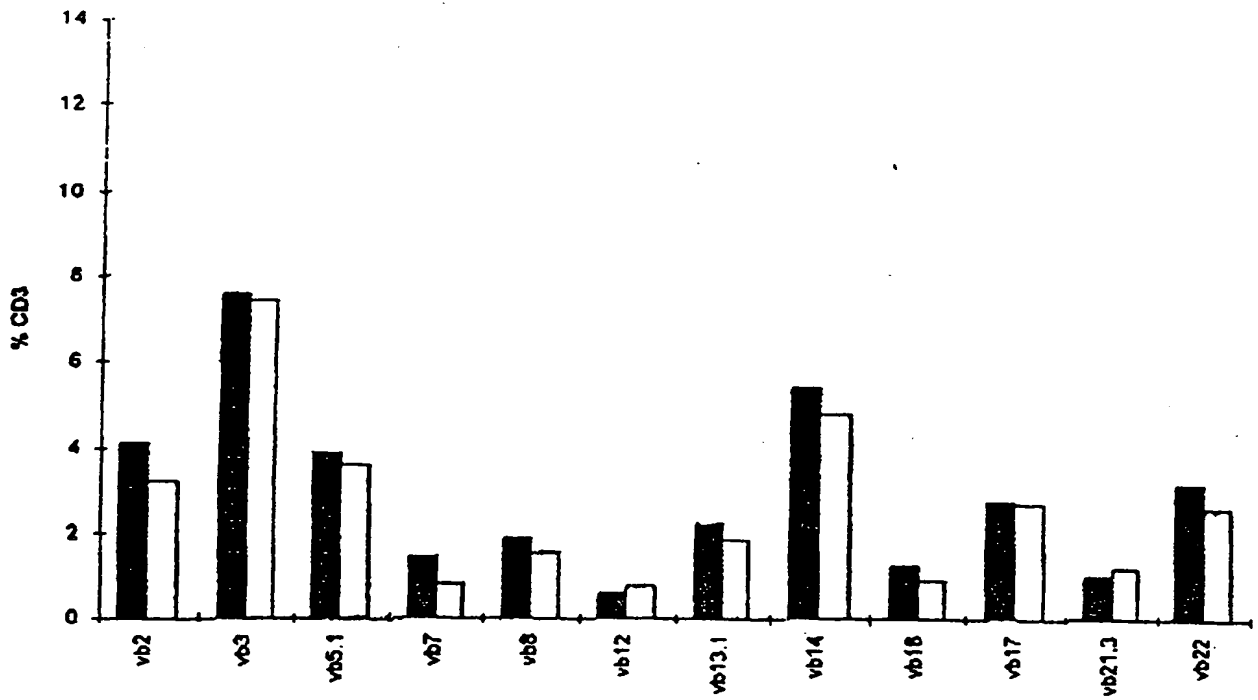
12,5 % (1/8) des donneurs présentent une expansion de l'une des familles V β 2, 7, 8, 14, 17 ou 22.

25

Les résultats obtenus avec les préparations LES et GRE peuvent être illustrés par l'analyse des répertoires obtenus avec les donneurs 10 et

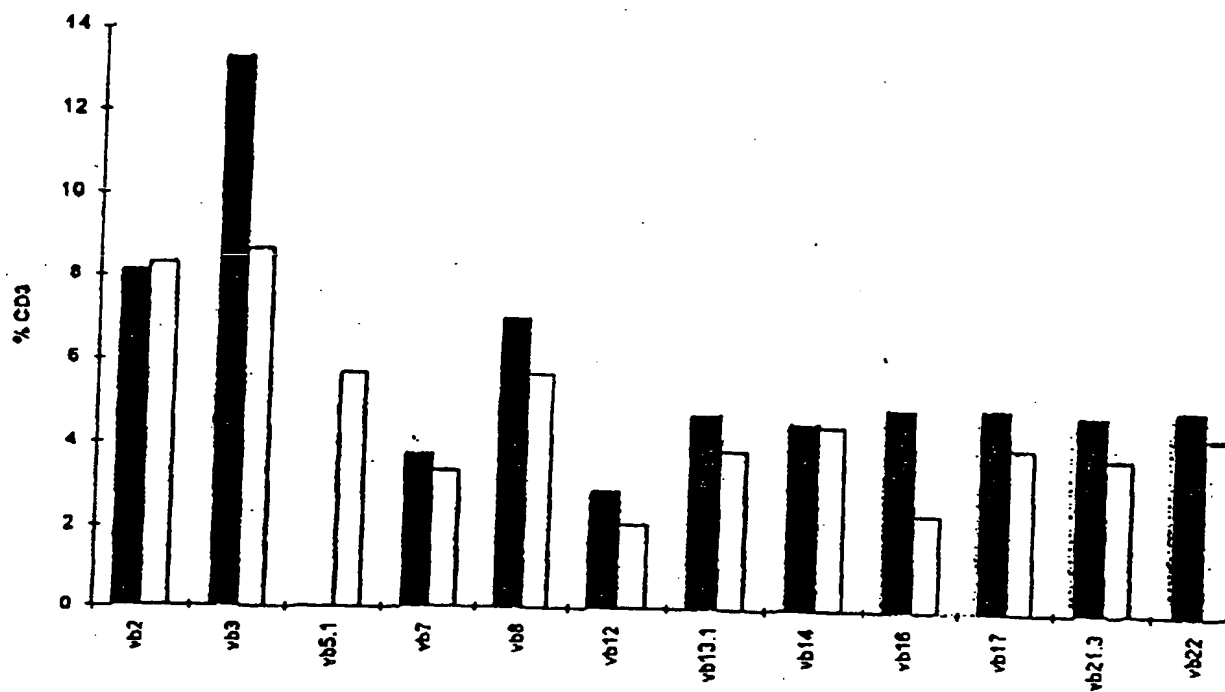
1 / 2

Figure 1



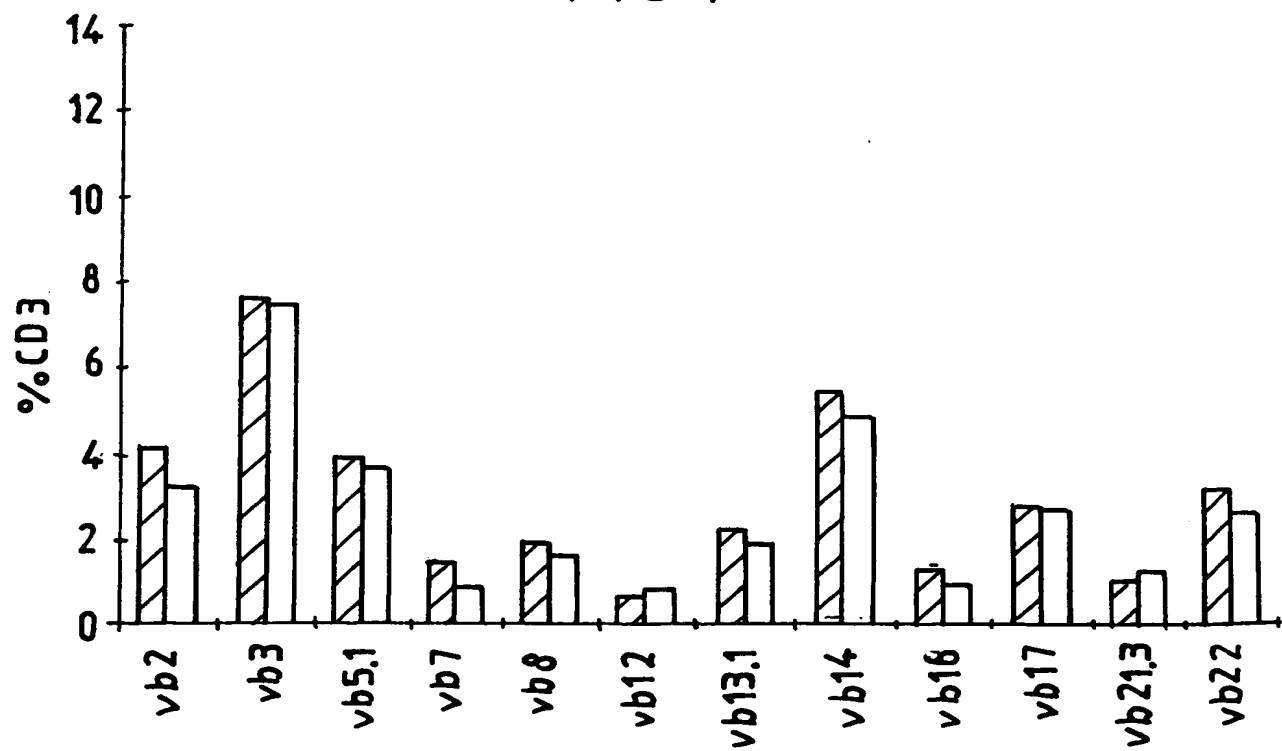
2 / 2

Figure 2



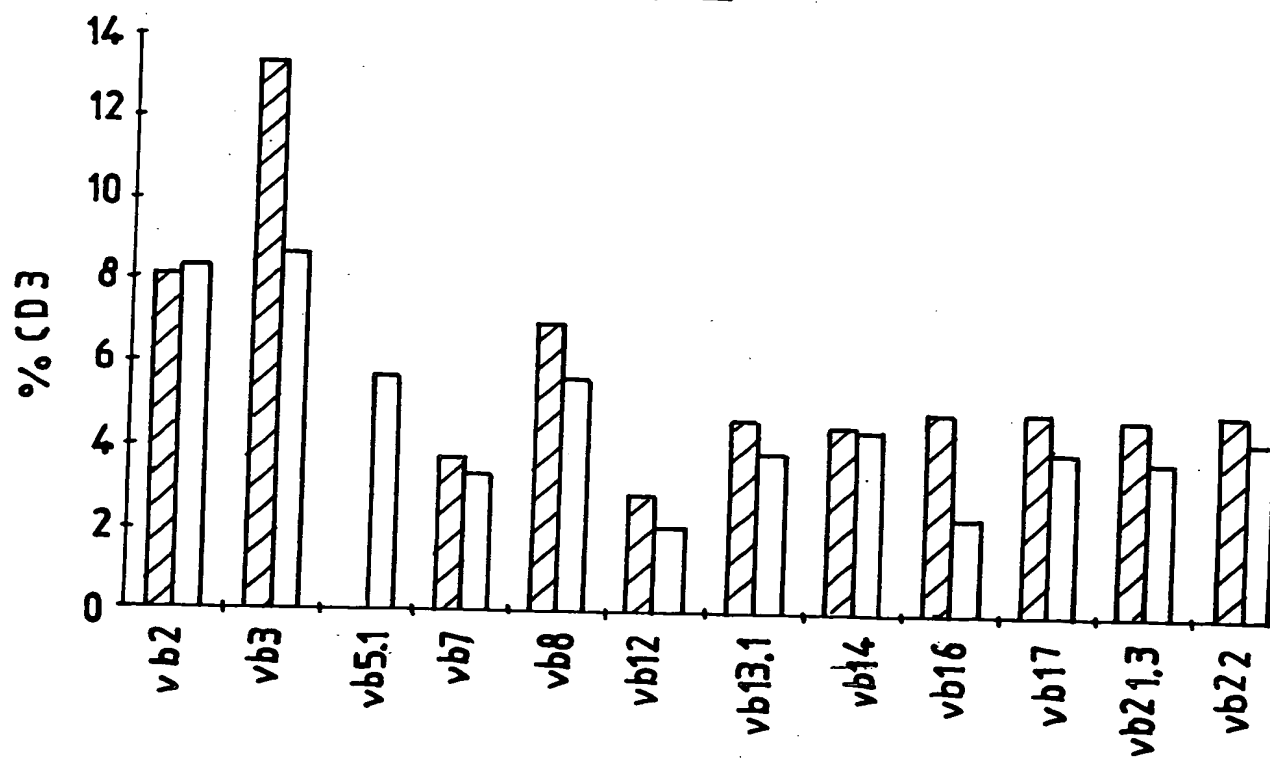
1/2

FIG 1



2/2

FIG 2



This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

mm

This Page Blank (uspto)